

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

03.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 6月28日

出願番号

Application Number:

特願2002-191496

[ST.10/C]:

[JP2002-191496]

出願人

Applicant(s):

株式会社島津製作所

REC'D 05 JUN 2003

WIPO

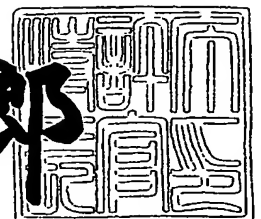
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3035947

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1020281

【提出日】 平成14年 6月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/68

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

 【氏名】 九山 浩樹

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

 【氏名】 安藤 英治

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

 【氏名】 西村 紀

【特許出願人】

 【識別番号】 000001993

 【氏名又は名称】 株式会社 島津製作所

 【電話番号】 075-823-1111

【代理人】

 【識別番号】 100100561

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 岡田 正広

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 064002

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質の解析法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式：



(式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物を含むラベル化試薬を用いるタンパク質の解析法

【請求項2】 前記有機基Rは構成元素としてC、H、N、場合によりO及び／又はPを含み、前記同位体は、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体である、請求項1に記載のタンパク質の解析法。

【請求項3】 前記スルフェニル化合物の分子量が、前記化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12大きい、請求項1又は2に記載のタンパク質の解析法。

【請求項4】 前記同位体で標識された構成元素の数が3以上である、請求項1～3のいずれか1項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項5】 前記有機基Rは、置換されていても良いアルキル基又はアリール基である、請求項1～4のいずれか1項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項6】 前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、請求項1～5のいずれか1項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項7】 前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、請求項1～5のいずれか1項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項8】 前記有機基Rが置換されていても良いフェニル基である、請

求項5又は7に記載のタンパク質の解析法。

【請求項9】 前記脱離基Xが、ハロゲン原子である、請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項10】 前記式(I)で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物が、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2,4-ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれる、請求項1～5及び7～9のいずれか1項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項11】 前記ラベル化試薬が、前記式(I)で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物から選ばれた1つの化合物(重い試薬)と、前記選ばれた化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物(軽い試薬)とをそれぞれ別個に含む、請求項1～10のいずれか1項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項12】 前記ラベル化試薬を用いて、解析すべきペプチドのアミノ酸残基をラベル化し、得られたラベル化ペプチドをマスマスペクトロメトリーにより測定する、請求項1～11のいずれか1項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項13】 (1) 解析すべきペプチドを、前記式(I)で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物から選ばれた1つの化合物(重い試薬)、及び前記選ばれた化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物(軽い試薬)のいずれか一方を用いてラベル化し、ラベル化された解析すべきペプチドを得て、

(2) 別途、対照ペプチドを、前記重い試薬及び前記軽い試薬のいずれか他方を用いてラベル化し、ラベル化された対照ペプチドを得て、

(3) (1)で得られたラベル化された解析すべきペプチドと(2)で得られたラベル化された対照ペプチドとを混合し、

(4) 混合したラベル化ペプチドをマスマスペクトロメトリーによって測定する、請求項1～12のいずれか1項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項14】 前記ラベル化の前又は後に必要に応じ、還元及びアルキル

化による化学的処理を行う、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項 1 5】 前記ラベル化の後に、必要に応じゲル濾過による分離と逆相カラムを用いる分離とを含むラベル化ペプチドの精製を行う、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項 1 6】 前記化学的処理の後、前記ラベル化の前、又は、前記ラベル化の後、前記精製の前に、必要に応じ酵素消化を行う、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の解析法。

【請求項 1 7】 前記アミノ酸残基がトリプトファン残基である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の解析法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ラベル化試薬を用いてタンパク質を解析する技術に関する。

【0002】

【従来の技術】

スルフェニル化合物は、トリプトファン残基のインドール環と反応するため、従来からトリプトファン残基の選択的ラベル化試薬として知られている。タンパク質の解析法としては、従来から 2 次元ゲル電気泳動 (2 D - P A G E) による方法が用いられている。この方法においては、まず、生体試料から抽出されたタンパク質を 2 D - P A G E を用いて分離・精製し、2 次元的に得られるゲルイメージから目的とするスポットを切り出す。次いで還元アルキル化、酵素消化などの工程を経てマスマスペクトロメトリーにより (例えば P M F 法)、注目するスポットがどのようなタンパク質であるかを解析する。また、ディファレンシャルディスプレイにより 2 種の生体資料中のタンパク質の相対量比を求めることができる。

【0003】

しかしこの方法では、高濃度で含まれるタンパク質 (ハウスキーピングタンパク質) が存在する場合、低濃度で存在する調節タンパク質などは細胞全体のライ

セートを分析した場合、ほとんど検出できないという問題がある。また、ディフュージョンディスプレイでの定量性が不十分であること、ゲル板の不均一性に起因する再現性の無さ、高分子タンパク質の分離が困難であることなども問題であった。

【0004】

一方、昨今のポストゲノムの流れの中で、タンパク質の効率的な消化方法、消化によって生じた複雑なポリペプチド混合物の分離方法、及びポリペプチドのアミノ酸配列を解析するマスマススペクトルのイオン化法が開発され、ペプチドをマスマススペクトルで解析できるようになった。これに伴い、マスマススペクトルを応用するという観点からのペプチドの解析法が種々考案されてきており、新規で有用なラベル化試薬が求められている。このような観点から開発された試薬の1つに、ICAT (Isotope Coded Affinity Tag) 試薬が挙げられる。これを用いる方法は、ワシントン大学のAebersoldらにより開発された、タンパク質発現量の変化を定量する方法の1つである。(R.Aebersold et al., Nature Biotech., 1999, 17, 994-999, WO 00/11208) ICAT法ではタンパク質中のシステイン残基に注目し、ビオチンを含む特殊なアルキル化試薬によりシステインのSH基をラベル化する。この方法は発現された広い量的な差異を持つ生体内タンパク質を定量することができ、タンデムマスと組み合わせて発現量に変化したタンパク質の同定も可能である。

【0005】

しかし、タンパク質中のシステイン含量が大きいと、上記の方法では最終的に得られるマスマススペクトルが複雑であることが予想される。また、ラベル化されたペプチドフラグメントを分離するためにアビジンカラムという特殊なカラムを必要とすることや、反応試薬の分子量が比較的大きい(600程度)ため反応性が十分でないことも問題である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、反応性及び選択性に優れ、マスマススペクトルでの解析が容易で定量性も高く、かつ特殊なカラムを必要としないラベル化試薬を用いたタンパク

質の解析方法を提供することにある。

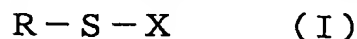
【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意検討した結果、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を持つスルフェニル化合物を用いることによって、上記目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、一般式：



(式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物を含むラベル化試薬を用いるタンパク質の解析法である。

【0009】

本発明は、前記有機基Rは構成元素としてC、H、N、場合によりO及び／又はPを含み、前記同位体は、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体である、前記のタンパク質の解析法である。

本発明は、前記スルフェニル化合物の分子量が、前記化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12、好ましくは6～10大きい、前記のタンパク質の解析法

本発明は、前記同位体で標識された構成元素の数が3以上、例えば3～12、好ましくは6～10である、前記のタンパク質の解析法である。

【0010】

本発明は、前記有機基Rは、置換されていても良いアルキル基又はアリール基である、前記のタンパク質の解析法である。

【0011】

本発明は、前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、前記のタンパク質の解析法である。

【0012】

本発明は、前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、前記のタンパク質の解析法である。

本発明は、前記有機基Rが置換されていても良いフェニル基である、前記のタンパク質の解析法である。

【0013】

本発明は、前記脱離基Xが、ハロゲン原子である、前記のタンパク質の解析法である。

【0014】

本発明は、前記式(I)で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物が、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2, 4-ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれる、前記のタンパク質の解析法である。

【0015】

本発明は、前記ラベル化試薬が、前記式(I)で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物から選ばれた1つの化合物(重い試薬)と、前記選ばれた化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物(軽い試薬)とをそれぞれ別個に含む、前記のタンパク質の解析法である。

【0016】

本発明は、前記重い試薬が、前記軽い試薬との分子量の差が3~12、好ましくは6~10となるように設計された、前記のタンパク質の解析法である。

【0017】

本発明は、前記ラベル化試薬を用いて解析すべきペプチドアミノ酸残基をラベル化し、得られたラベル化ペプチドをマスマススペクトロメトリーにより測定する、前記のタンパク質の解析法である。

【0018】

本発明は、

(1) 解析すべきペプチドを、前記式 (I) で表される同位体で標識されたスルフェニル化合物から選ばれた 1 つの化合物 (重い試薬)、及び前記選ばれた化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物 (軽い試薬) のいずれか一方を用いてラベル化し、ラベル化された解析すべきペプチドを得て、

(2) 別途、対照ペプチドを、前記重い試薬及び前記軽い試薬のいずれか他方を用いてラベル化し、ラベル化された対照ペプチドを得て、

(3) (1) で得られたラベル化された解析すべきペプチドと (2) で得られたラベル化された対照ペプチドとを混合し、

(4) 混合したラベル化ペプチドをマスマスペクトロメトリーによって測定する、前記のタンパク質の解析法である。

【0019】

本発明は、前記ラベル化の前又は後に必要に応じ、還元及びアルキル化による化学的処理を行う、前記のタンパク質の解析法である。

【0020】

本発明は、前記ラベル化の後に、必要に応じゲル濾過による分離と逆相カラムを用いる分離とを含むラベル化ペプチドの精製を行う、前記のタンパク質の解析法である。

本発明は、前記化学的処理の後、前記ラベル化の前、又は、前記ラベル化の後、前記精製の前に、必要に応じ酵素消化を行う、前記のタンパク質の解析法である。

【0021】

本発明は、前記アミノ酸残基がトリプトファン残基である、前記のタンパク質の解析法である。

【0022】

【発明の実施の形態】

本発明は、式：



(式中、R は、同位体で標識された少なくとも 1 つの構成元素を有する有機基を表し、X は脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物をラベル化試薬として用いたタンパク質の解析法である。本発明においては解析すべきペプチドのアミノ酸残基のラベル化を行い、得られたラベル化ペプチドを精製し、マススペクトロメトリーにより測定する。式(I)に表される前記重い試薬と、前記軽い試薬とを、それぞれ別個に含む2種のラベル化試薬を組み合わせる用いることにより、マススペクトルを応用したタンパク質の解析が容易になる。

【0023】

なお、本明細書において、オリゴペプチドやポリペプチドなどの鎖状ペプチド及びタンパク質の立体構造を構成しているポリペプチドを「ペプチド」と総称し、「タンパク質」は前記「ペプチド」を含む意味として記載する。

【0024】

本発明においてラベル化試薬として用いるスルフェニル化合物は(I)式で表され、式中のアルキル基Rは、構成元素としてC、H、N、場合によりO及び/又はPを含む置換基である。同位体としては、安定同位体が好ましく、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O などが挙げられる。

【0025】

重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いるとき、重い試薬によってラベル化されたペプチド及び軽い試薬によってラベル化されたペプチドを混合してマススペクトロメトリーによって測定する。この場合、前述の同位体の存在によって、それぞれのラベル化ペプチドのマス値に差が生じる。この差は、重い試薬の分子量と軽い試薬の分子量との差に相当する。

このとき、マス値の差は3～12マスが好ましく、6～10マスがより好ましい。マス値の差が3マス以上開くことにより、重い試薬による化学修飾を受けたラベル化ペプチドと、軽い試薬による化学修飾を受けたラベル化ペプチドとの双方のスペクトルピークが重なりにくくなるため、解析がしやすい。

【0026】

このことから、本発明においてスルフェニル化合物の分子量は、その化合物と同一構造であり且つ同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12大きいことが好ましく、6～10大きいことがより好ましい。従って、本発明にお

いてスルフェニル化合物が同位体として ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O などの質量数が1大きい同位体のみを含む場合、同位体で標識された構成元素の数は3以上、例えば3～12個が好ましく、6～10個がより好ましい。

一方、本発明において用いるスルフェン酸誘導体が同位体として ^{18}O などの質量数が2大きい同位体を含む場合は、3以上のマス値の差を与えるために3個以上の同位体を必要としない場合もある。例えば、同位体として ^{18}O のみを含むスルフェニル化合物の場合、 ^{18}O で標識された構成元素が2個あれば、マススペクトルにおいて4マスの差が生じ、好ましいマス値の差を与えることができる。

【0027】

そして、これらスルフェニル化合物を重い試薬とし、軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いる場合は、重い試薬の分子量は、軽い試薬の分子量との差が3～12なるように設計されることが好ましく、6～10となるように設計されることがより好ましい。

【0028】

前記(I)式中の有機基Rは、置換されていても良いアルキル基又は置換されていても良いアリール基であることが好ましい。前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基などが挙げられるが、これらに限定されない。

また、前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基などが挙げられるが、これらに限定されない。

これら置換基は、当該試薬の反応性、溶解性などを調節するため適宜選択することができる。

また、前記有機基Rは、置換されていても良いフェニル基であることが好ましい。

【0029】

好ましく設定された有機基Rを有することにより、ラベル化試薬として用いた時に、逆相カラムなど通常のカラムにより容易にラベル化ペプチドの分離ができ

るようになる。

【0030】

前記(I)式中の脱離基Xとしては、F、Cl、Br、Iなどのハロゲン原子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0031】

本発明のスルフェニル化合物の分子量は、ラベル化すべきタンパク質との反応性を考慮して、190程度が好ましい。

【0032】

特に、本発明のスルフェニル化合物としては、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2, 4-ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドが好ましい。

【0033】

本発明のスルフェニル化合物は、対応するジスルフィド、チオール、スルフィドなどからハロゲン化などの方法により合成できる。例えば、有機基Rとして6個の ^{13}C で標識されたフェニル基を有するスルフェニル化合物を、例えばスルフィドから合成する方法として、以下に記述する方法が挙げられる。

【0034】

まず、前駆体のスルフィドは、例えばニトロ [$^{13}\text{C}_6$] クロロベンゼンなどの [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼン誘導体にベンジルメルカプタンを反応させることにより、 [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィドとして得る。

次に、得られた [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィドに、ハロゲン化剤を反応させ、目的とするスルフェニル化合物を得る。ハロゲン化剤としては、スルフリルクロリドや臭素などを用いると良い。溶媒としては、四塩化炭素、エチレンクロリドなどを用いると良い。反応条件としては、例えば10℃～45℃で5分～1時間かけて反応させる。

これらの諸条件は、当業者が適宜定めると良い。

【0035】

本発明のスルフェニル化合物を用いることにより、同定すべき化合物の目印と

なる標識置換基（R-S-基）として導入することができるため、ラベル化試薬として用いることができる。

スルフェニル化合物は、タンパク質のペプチド中に存在するトリプトファン残基のインドール環と選択的に反応することが知られているため、特に本発明の同位体で標識されたスルフェニル化合物は、タンパク質の解析におけるラベル化試薬として有用である。

【0036】

トリプトファンはタンパク質において、機能的にも活性面でも重要な役割を演じているアミノ酸である。トリプトファンを含むペプチドは、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、ガラニン（Galanin）、副甲状腺ホルモン（PTH）、 α -キモトリプシン、グラミシジンA、リゾチームなどが挙げられる。

トリプトファンのタンパク質中含量は、アミノ酸の中でも最も少ない部類に属するため、ラベル化反応及び酵素消化後のペプチドのマススペクトルが単純となり、その解析が容易となる。これはプロテオーム解析を行う上で大変有利である。

【0037】

スルフェニル化合物（同位体で標識された本発明のスルフェニル化合物及び従来の標識されていないスルフェニル化合物）は、トリプトファン残基が有するインドール環へ求電子置換反応し、チオエーテル結合を介した標識置換基として導入されることにより、トリプトファン残基をラベル化する。この反応は、ICAT法におけるシステイン残基とICAT試薬との求核置換反応よりも反応性が高いということが期待できる。

【0038】

本発明においては、解析すべきペプチドのアミノ酸残基をラベル化し、得られたラベル化ペプチドを精製し、マススペクトロメトリーにより測定する。本発明は、ラベル化反応、マススペクトルの測定の過程を含む。重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いる場合は、ラベル化反応、ラベル化ペプチドの混合、マススペクトルの測定の過程を含む。

また本発明においては、必要に応じ、還元とアルキル化とによる化学的処理、

及び酵素的処理によるペプチドの断片化を行う工程を含む。

さらに本発明においては、必要に応じゲル濾過による分離と、逆相カラムを用いる分離とを含む精製の工程を含む。

【0039】

重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いる場合、解析すべきペプチドとは別に、対照ペプチドを用意する。例えば、解析すべきペプチドが病細胞に由来するタンパク質であり、一方、対照ペプチドが正常細胞に由来するタンパク質である。これらは、互いにタンパク質構成が異なるサンプルとして用いる。それぞれのサンプルは、それぞれ1種類ずつ用いても良いし、一方及び／又は他方を2種類以上用いても良い。

【0040】

ラベル化反応は、通常の方法を用いて行う。重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いる場合は、解析すべきペプチドを、重い試薬及び軽い試薬のいずれか一方を用いてラベル化を行い、別途、対照ペプチドを、重い試薬及び軽い試薬のいずれか他方を用いてラベル化を行う。例えば、解析すべきペプチドを重い試薬を用い、対照ペプチドを軽い試薬を用いてラベル化しても良いし、解析すべきペプチドを軽い試薬を用い、対照ペプチドを重い試薬を用いてラベル化しても良い。

このようにして別々にラベル化することによって、少なくとも2種類のラベル化ペプチドを得ることができる。

【0041】

また、ペプチドのラベル化の前又は後に、必要に応じて還元とアルキル化とによる化学的処理を行うことが好ましい。ペプチドはシステイン残基やジスルフィド結合を有することがある。システイン残基は反応性が高くジスルフィド結合を形成しやすいため、予期せぬペプチド構造を形成することがある。また、ジスルフィド結合は高いpH環境において他のジスルフィド結合と交換する性質があるため、通常高いpH環境で行われる酵素的処理（酵素消化）の段階でペプチド構造が変化し、解析が困難になることがある。この化学的処理を行うと、これらの問題を回避することができ、さらに、後の酵素消化を効率的に行うことができる。

ようになる。なお、アルキル化の形態としては、S-カルバミドメチル化やS-カルボキシメチル化などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0042】

必要に応じ化学的処理されたペプチドは、ラベル化工程の前後において、必要に応じ酵素消化を行う。例えば、化学的処理の後、ラベル化反応の前に行っても良いし、ラベル化の後、精製の前行っても良い。酵素消化によってペプチドはペプチドフラグメントに断片化される。

酵素消化に用いる酵素は、高い基質特異性を持つトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、トロンピン、プラスミン、カリクレイン、ウロキナーゼなどのエンドペプチダーゼが好ましい。

【0043】

前述のようにして得られたラベル化トリプトファン残基含有ペプチド（ラベル化ペプチドフラグメント）は、精製されることが好ましい。ラベル化トリプトファン残基含有ペプチドは、ラベル化前のトリプトファン残基含有ペプチドよりも疎水性が高い。このため、通常使用されるODSなどを用いた逆相カラムによって、ラベル化ペプチドフラグメントとラベル化しなかった未反応のペプチドフラグメントとの分離が容易にできる。従って本発明においては、I C A T法で用いるような特殊なカラムを使用する必要がなくなるという利点がある。

【0044】

また、逆相カラムでの精製を行う前に、ゲル濾過を行うことがより好ましい。ゲル濾過用担体は、セファデックス、バイオゲル、アガロースゲルなどが挙げられるが、セファデックスが好ましい。また、セファデックスは架橋度がG-25のものが最適である。ゲル濾過によって、未反応及び加水分解を受けたラベル化試薬を分離することができ、より純度の高いラベル化ペプチドフラグメントを得ることができる。

【0045】

必要に応じ精製されたラベル化ペプチドフラグメントは、マスマススペクトロメトリによって測定される。重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いた場合は、マスマススペクトルの測定を行う前に、それぞれのラベル化ペプチド

を混合する必要がある。それぞれのラベル化ペプチドは、マスペクトルの測定時に混合された状態であれば良いため、混合する時期は、ラベル化の後、マスペクトルの測定の前であれば、酵素消化または精製のいずれの段階でも良い。混合されたラベル化ペプチドフラグメントは、マスペクトロメトリーによって測定される。

【0046】

マスペクトロメトリーのイオン化法としては、FD法、SIMS法、FAB法、MALDI法、ESI法などが挙げられる。分析計としては、二重収束質量分析計、四重極型分析計、飛行時間型(TOF)質量分析計、フーリエ変換質量分析計、イオンサイクロトロン質量分析計などが挙げられる。

【0047】

本発明においては、1台の質量分析計によるマスペクトル(MS)の結果と、これらの質量分析計を2台直列に接続したタンデムマスペクトル(MS/MS)の結果とを組み合わせることでタンパク質の解析を行うことができる。

【0048】

重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたラベル化試薬を用いた場合、マスペクトル(MS)では、軽い試薬の分子量と重い試薬の分子量との差に相当する質量差をもつ一組のピークを見つけることにより、それぞれのサンプル中に共通して存在するペプチドフラグメントのモル比を知ることができる。このことから、ペプチドフラグメントに相当するタンパク質の比を直接知ることができる。また、タンデムマスペクトル(MS/MS)と、データベースの検索とにより得られるペプチドの配列情報から、ペプチドフラグメントに相当するタンパク質の同定をすることができる。

【0049】

前述のように、本発明によると、両方に共通して存在しているタンパク質の種類とその比率の違いが分かる。また、特定のタンパク質がサンプル中の他のタンパク質に比べてどれ位含まれているかということも知ることができる。つまり本発明によると、分子レベルで、通常細胞と病細胞とのペプチド構成の違いを知ることができる。より詳しくは、病細胞の活動化段階をコントロールしているメカ

ニズムを解明する手がかりを知ることができる。

【0050】

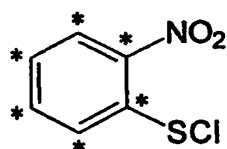
【実施例】

以下に実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。

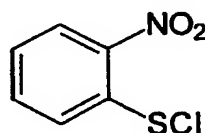
本実施例及び分離実験例において用いたラベル化試薬を化1に示す。式中、*は、 ^{13}C で標識された炭素原子を表す。

【0051】

【化1】



重い試薬



軽い試薬

【0052】

〔ラベル化試薬（重い試薬）の調製〕

1 g ($6.1 \times 10^{-3} \text{mol}$) の2-ニトロクロロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンを1 ml のメタノールに溶解し、ここに0.8 g ($6.6 \times 10^{-3} \text{mol}$) のベンジルメルカプタン、0.8 ml (0.01 mol) のピリジンを加え、16時間加熱還流した。室温に放冷し2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィドを析出させ、この結晶を濾別し、メタノールで洗浄した。風乾後黄色結晶として2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィド1.38 g (90%) が得られた。

【0053】

得られた2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィド1.38 g ($5.5 \times 10^{-3} \text{mol}$) にエチレンクロリド10 mlを加え、さらにスルフリルクロリド940 mg ($7.9 \times 10^{-3} \text{mol}$)を加え、室温で攪拌した。反応溶液を湯浴で50～60℃に加温しながら減圧濃縮した。得られた油状物に石油エーテルを加え、生じた結晶を濾別した。結晶を石油エーテルで洗浄し風乾して2-ニ

トロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドを 938 mg (87%) を得た。

【0054】

〔分離実験例 1〕

モデルペプチドとして ACTH、Galani n 及び PTH、ラベル化試薬として 2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (軽い試薬) を用い、ラベル化されたペプチドとラベル化されていないペプチドとが分離されるかどうかを確認する実験を行った。

【0055】

ACTH 160 μg ($5.4 \times 10^{-8} \text{mol}$) を 70% 酢酸水溶液 100 μl に溶解した。ここに 2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド 0.41 mg (40 μmol) を加え、室温下 1 時間ボルテックスミキサーにより攪拌した。反応溶液を氷冷後、氷冷したエーテル 800 μl を加え、遠心分離した。沈殿を氷冷したエーテルで洗浄し、ラベル化体を得た。ラベル化したペプチドと、ラベル化に供しなかったペプチドとをそれぞれ混合し、逆相カラム (LC) による分離を行った。Galani n 及び PTH についても同様にして分離を行い、それぞれの保持時間を以下に示した。(ラベル化したペプチドは、mod-を用いて表した。) なお、簡略された系であるため、酵素消化は行わなかった。

【0056】

(保持時間)

ACTH	16.57 分
mod-ACTH	34.78 分
Galani n	21.78 分
mod-Galani n	35.27 分
PTH	24.78 分
mod-PTH	35.47 分

【0057】

(条件)

A buffer: 0.01 M $\text{HCOOH-Et}_3\text{N}$ (pH 4.5)

B buffer: 0.01 M $\text{HCOOH-Et}_3\text{N}$ (pH 4.5) in CH_3CN

Bの勾配:0%~100%を50分かけて流した。

カラム:Shimpack VP-ODS、250*4.5mm

【0058】

上に示すように、ラベル化されたものとそうでないものとは、3種全てにおいて保持時間に10~18分の差が生じた。従って、LCによってラベル化ペプチドのみを分離できることが分かった。

また、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (重い試薬) を用いて同様の分離実験を行ったところ、保持時間はほぼ同一であったため、重い試薬でもラベル化ペプチドのみを分離できることが分かった。

【0059】

[分離実験例2]

(ラベル化)

モデルタンパク質としてリゾチームを用い、分離実験例1と同じ趣旨の分離実験を行った。リゾチームを分離実験例1と同様の方法で「軽い試薬」を用いてラベル化し、洗浄、凍結乾燥した。

(ジスルフィド結合の還元)

ここに、100mM NH_4HCO_3 溶液を加えて溶解し、1つのジスルフィド結合に対し50倍量のDTTを加え、56℃で1時間反応させた。

【0060】

(S-カルバミドメチル化)

反応溶液を室温まで放冷後、ヨードアセトアミドの100mM NH_4HCO_3 溶液を加え、室温で1時間反応させた。反応溶液をセファデックスG10のカラムで精製し、凍結乾燥した。

(消化)

ここに50mM NH_4HCO_3 -5mM CaCl_2 溶液に溶解したトリプシンを適当量加え、37℃、16時間反応させた。

【0061】

ジスルフィド結合の還元、S-カルバミドメチル化、酵素消化の一連の処理を行ったラベル化ペプチドをLCにより分離を行った。その結果、保持時間29~

39分の画分 (Fr.a) に目的とするラベル化ペプチドが全て含まれていた。このときのLCチャートを図1に示し、観測されたリゾチーム由来のペプチドのピークを表1にまとめた。表中、括弧内の数字はアミノ酸配列の番号を表し、Wが付された数字はラベル化されたトリプトファンを含有するペプチドを表す。

【0062】

【表1】

before LC	after LC (Fr.a)
874.81 (15-21)	
1198.86 (117-125W)	1198.45 (117-125W)
1299.74 (62-68W)	1299.25 (62-68W)
1429.06 (34-45)	
1479.03 (22-33W)	1479.38 (22-33W)
1487.07 (115-125W)	1486.42 (115-125W)
1754.34 (46-61)	

【0063】

(条件)

A: 0.1% TFA

B: 0.07% TFA in CH₃CN

Bの勾配: 0%~100%を100分かけて流した。

カラム: Shimpack VP-ODS、150*4.6mm

【0064】

上に示すように、LCによってラベル化ペプチドのみを分離できることが分かった。

また、2-ニトロ [¹³C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド (重い試薬) を用いて同様の分離実験を行ったところ、重い試薬でもラベル化ペプチドのみを分離できることが分かった。

【0065】

【実施例】

まず、サンプルペプチドとしてACTH、Galaninを用い、2つの異なる状態の細胞をこれらのペプチドの含有比率を次のように設定することでモデル化した。

- ・セルA ACTH : Galanin = 1 : 1 (モル比)
- ・セルB ACTH : Galanin = 1 : 2 (モル比)
- ・セルAとセルBのペプチド含有モル比 セルA : セルB = 2 : 3

次に、これら各々の系について、セルAについては「軽い試薬」を用い、セルBについては「重い試薬」を用い、分離実験例1と同様の方法でラベル化反応を行った。これらの系は簡略化されたものであるため、酵素消化などは行わなかった。

さらに、ラベル化反応後のこれら2つの系を混合し、セファデックスG25を用いてゲル濾過した。

【0066】

ゲル濾過したペプチドを、LCを用いてラベル化ペプチドのみを分離した。このようにして得られたラベル化ペプチドを、MALDI TOFMSによって測定した。得られたマスペクトルを図2及び図3（図2の続き）に示した。

【0067】

マスペクトルの結果より、ピーク強度比から、設定したペプチド含有率が正確に反映された。「軽い試薬」によって修飾を受けたペプチドをL-mod、「重い試薬」によって修飾を受けたペプチドをH-modと表した。

- ・分子イオン(m/z)

3086.60 [ACTH(L-mod)]、3092.64 [ACTH(H-mod)]、3316.68 [Galanin(L-mod)]、3322.68 [Galanin(H-mod)]

- ・ピーク強度比

ACTH(L-mod) : ACTH(H-mod) = 1 : 1

Galanin(L-mod) : Galanin(H-mod) = 1 : 2

【0068】

【発明の効果】

本発明によれば、反応性及び選択性に優れ、マスペクトルでの解析が容易で

定量性も高く、かつ特殊なカラムを必要としないラベル化試薬を用いたタンパク質の解析方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 分離実験例 2 の LC チャートである。

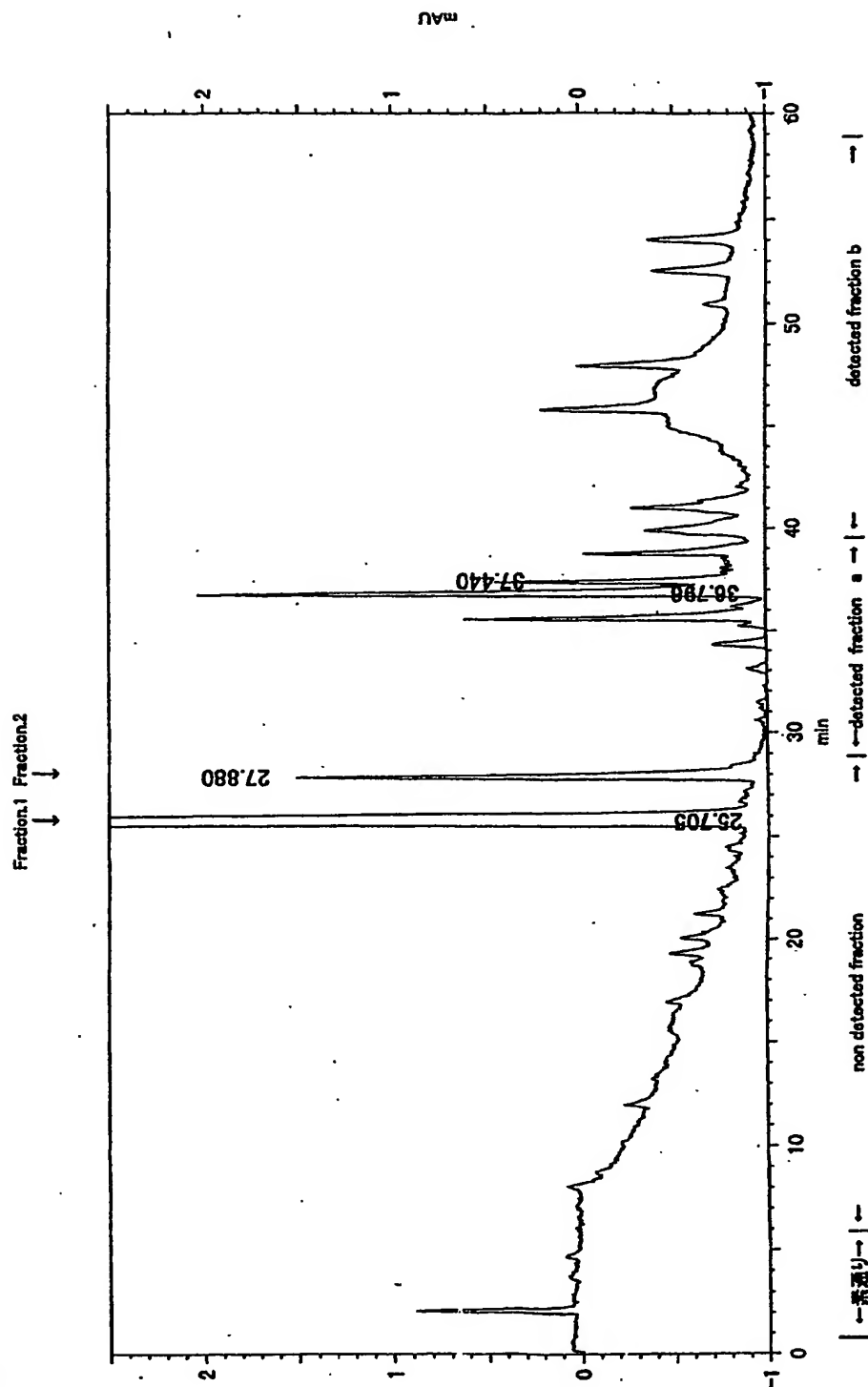
【図 2】 実施例のラベル化ペプチドを、MALDI TOFMS によって測定したスペクトルチャートである。

【図 3】 図 2 のチャートの続きである。

【書類名】

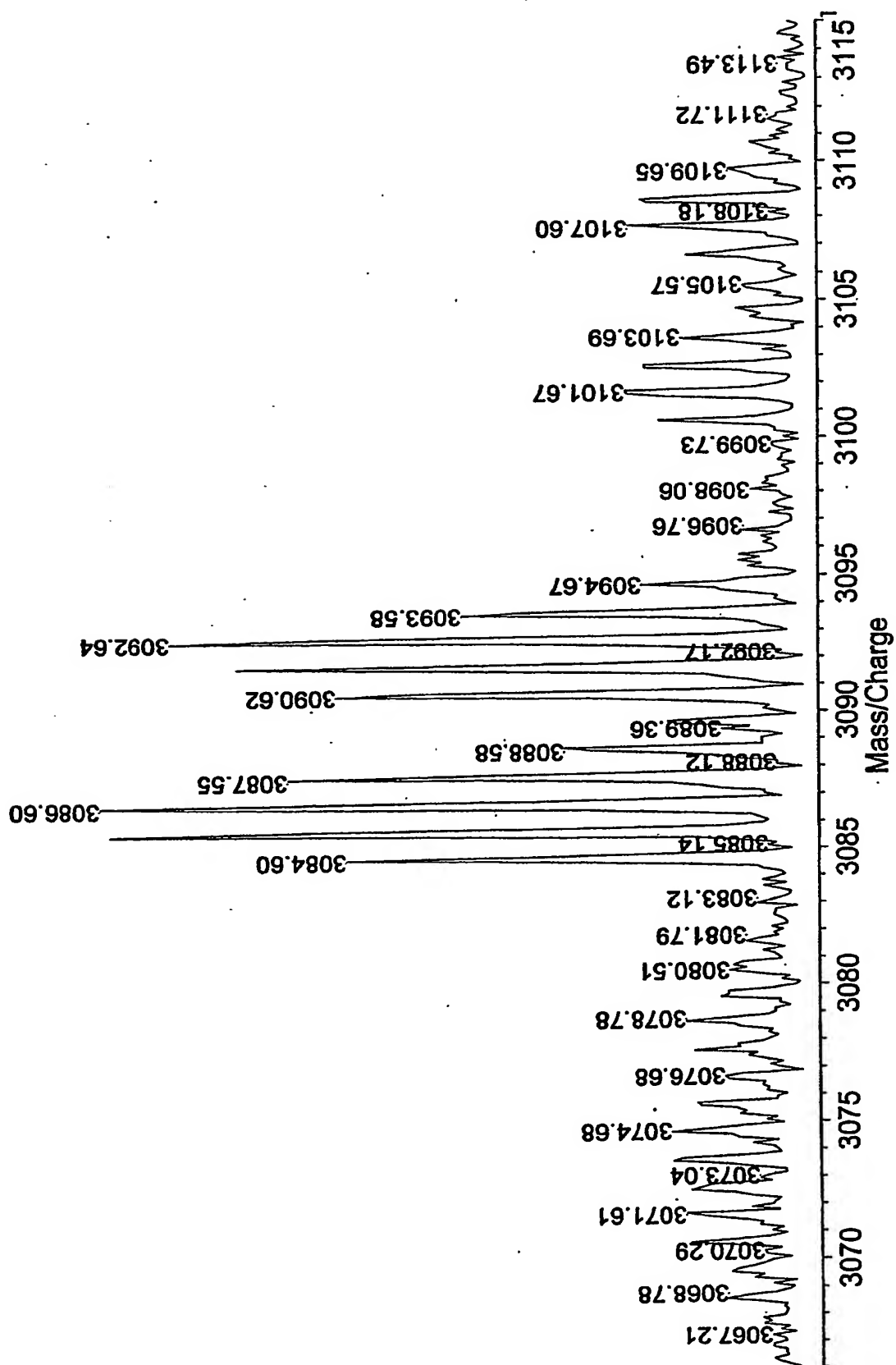
図面

【図1】

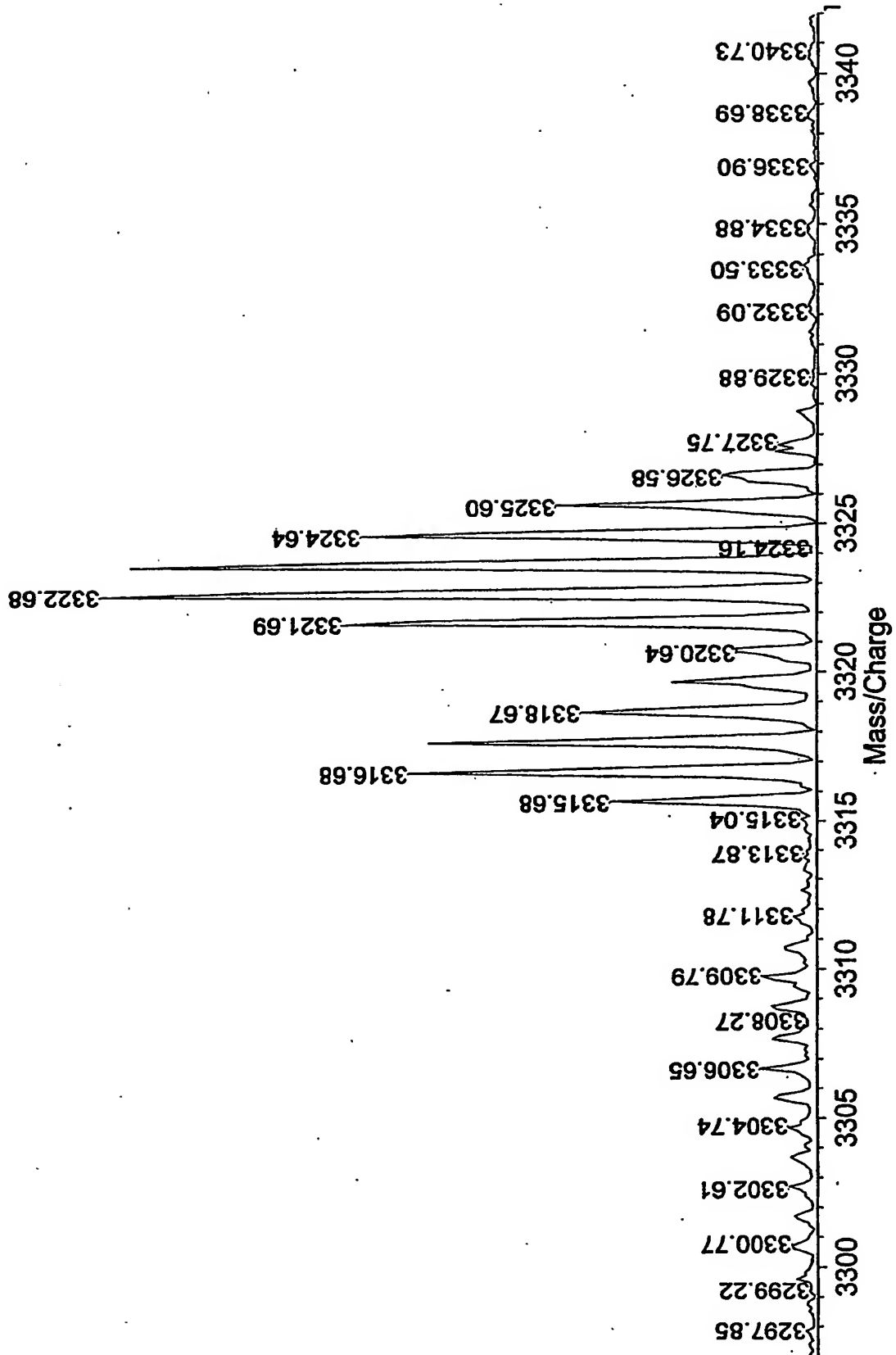


360 nm

【図2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 反応性及び選択性に優れ、マススペクトルでの解析が容易で定量性も高く、かつ特殊なカラムを必要としないラベル化試薬を用いたタンパク質の解析方法を提供する。

【解決手段】 一般式 $R-S-X$ (式中、 R は、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、 X は脱離基を表す。) で表されるスルフェニル化合物を含むラベル化試薬を用いるタンパク質の解析法。好ましくは、前記有機基 R は構成元素として C 、 H 、 N 、場合により O 及び/又は P を含み、前記同位体は、 2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体である。

【選択図】 図2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001993]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

氏 名 株式会社島津製作所